

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

JP03/17030

26.12.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年12月27日

出願番号
Application Number: 特願2002-380975
[ST. 10/C]: [JP2002-380975]

出願人
Applicant(s):

独立行政法人産業技術総合研究所
富士テレビオ株式会社

REC'D 19 FEB 2004

WIPO

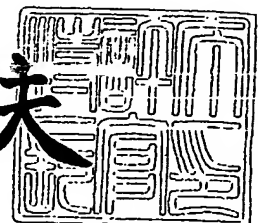
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 2月 5日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2004-3006441

【書類名】 特許願

【整理番号】 022164

【提出日】 平成14年12月27日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07H

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市梅園 1-1-1 独立行政法人産業技術
総合研究所つくばセンター内

【氏名】 成松 久

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市梅園 1-1-1 独立行政法人産業技術
総合研究所つくばセンター内

【氏名】 工藤 崇

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市梅園 1-1-1 独立行政法人産業技術
総合研究所つくばセンター内

【氏名】 梶谷内 晶

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市梅園 1-1-1 独立行政法人産業技術
総合研究所つくばセンター内

【氏名】 比留間 徹

【特許出願人】

【識別番号】 301021533

【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

【代表者】 理事長 吉川 弘之

【特許出願人】

【識別番号】 000237204

【氏名又は名称】 富士レビオ株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089705

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル2
06区 ユアサハラ法律特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 社本 一夫

【電話番号】 03-3270-6641

【選任した代理人】

【識別番号】 100076691

【弁理士】

【氏名又は名称】 増井 忠次

【選任した代理人】

【識別番号】 100075270

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 泰

【選任した代理人】

【識別番号】 100080137

【弁理士】

【氏名又は名称】 千葉 昭男

【選任した代理人】

【識別番号】 100096013

【弁理士】

【氏名又は名称】 富田 博行

【選任した代理人】

【識別番号】 100075236

【弁理士】

【氏名又は名称】 栗田 忠彦

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 051806

【納付金額】 10,500円

【その他】 国等以外のすべての者の持分の割合 50 / 100。国等の委託研究の成果に係わる特許出願（平成13年度新エネルギー・産業技術総合開発機構 糖鎖合成関連遺伝子ライブラリーの構築委託研究，産業活力再生特別措置法第30条の適用を受けるもの）。

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規な核酸及び該核酸を用いた癌化検定方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 1 に記載の塩基配列又はその相補的な塩基配列にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸。

【請求項 2】 配列番号 1 に記載の塩基配列中の少なくとも 15 個の連続する塩基配列又はその相補的な塩基配列からなる、請求項 1 に記載の核酸。

【請求項 3】 配列番号 1 に記載の塩基配列又はその相補的な配列からなる、請求項 2 に記載の核酸。

【請求項 4】 プローブまたはプライマーである、請求項 1～3 の何れか 1 項に記載の核酸。

【請求項 5】 癌マーカーである、請求項 1～4 の何れか 1 項に記載の核酸。

【請求項 6】 生物試料の癌化を検定する方法であって、

(a) 請求項 1～5 の何れか 1 項に記載の核酸を使用して、生物試料中の該核酸の転写レベルを測定し；そして

(b) 該生物試料中の該核酸の転写レベルが、対照の健常生物試料のそれを有意に上回る場合に、該生物試料が癌化していると判断することを含む方法。

【請求項 7】 生物試料の癌化を検定する請求項 6 に記載の方法であって、

(a) 請求項 1～5 の何れか 1 項に記載の核酸を標識されたプローブとして使用し、これを生物試料にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で接触させ、ここでハイブリダイズした核酸の標識からのシグナルに基づき該生物試料中の該核酸の転写レベルを測定し；そして

(b) 該生物試料中の核酸の転写レベルが、対照の健常生物試料中のそれを有意に上回る場合に、該生物試料が癌化していると判断することを含む方法。

【請求項 8】 生物試料の癌化を検定する請求項 6 に記載の方法であって、

(a) 標識された請求項 4 に記載のプライマーを使用して、生物試料について

核酸増幅を行い、且つ該核酸増幅産物の量を測定し；そして

(b) の該核酸増幅産物の量が、対照の健常生物試料中のそれを有意に上回る場合に、該生物試料が癌化していると判断することを含む方法。

【請求項 9】 癌治療に関する処置の有効性を、請求項 1～5 の何れか 1 項に記載の核酸を使用して検査する方法であって、

癌治療のための処置がなされた生物試料中の前記核酸の転写レベルを、請求項 1～5 の何れか 1 項に記載の核酸を使用して測定し、該測定値を、該処置前又は未処置のそれと比較することにより、該生物試料への該処置が有効であるか否かを判断することを含む方法。

【請求項 10】 既に癌化している前記生物試料を使用し、癌治療のための処置がなされた該生物試料中の前記核酸の転写レベルが、該処置前又は未処置のそれを有意に下回る場合に、該生物試料への該処置が有効であると判断することを含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】 前記生物試料が、非ヒトモデル動物の *in vivo* 生物試料である、請求項 9 又は 10 に記載の方法。

【請求項 12】 前記生物試料が大腸由来の試料である、請求項 6～11 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】 糖転移酵素タンパク質をコードする、配列番号 1 に記載の塩基配列を有する核酸。

【請求項 14】 DNA である、請求項 13 に記載の核酸。

【請求項 15】 請求項 13 又は 14 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 16】 請求項 15 に記載のベクターを含む形質転換体。

【請求項 17】 配列番号 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチド。

【請求項 18】 配列番号 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対する抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な核酸、癌化検定用の該核酸、及び生物試料中の該核酸の発現量が異なることに基づく該生物試料の癌化を検定する方法、並びに新規な糖転移酵素及びこれをコードする核酸等に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、生体内での糖鎖や複合糖質の働きが注目されている。例えば、血液型を決定する因子は糖タンパク質であり、また神経系の働きに関与しているのは糖脂質である。従って、糖鎖を合成する働きのある酵素は、様々な糖鎖がもたらす生理活性を解析する上で極めて重要な手がかりとなる。

糖の中でN-アセチル-D-グルコサミン残基 (GlcNAc) やD-ガラクトース残基 (Gal) 等はグリコサミノグリカンの構成成分であると共に、スフィンゴ糖脂質、ムチン型糖鎖と様々な糖鎖構造に存在する糖残基である。従って、GlcNAc又はGalを転移する酵素は、生体内の様々な組織で働く糖鎖の働きを解析する上で極めて重要なツールとなる。

【0003】

例えば、GlcNAcを転移する活性を有するN-アセチルグルコサミン酵素は、少なくとも19種類知られており、各々、受容体基質特異性が異なる(表1の非特許文献1~19)。また、Galを転移する活性を有するD-ガラクトース酵素は、少なくとも15種類知られており、各々、受容体基質特異性が異なる(例えば、表2の非特許文献20~29)。

他方、糖鎖合成は癌化において非常に良く変化することが知られており、癌の転移や悪性度と相関することが知られている(非特許文献30~32)。また、各種組織における発現プロファイル等の解析など、今日盛んなそれらの網羅的研究は、癌化メカニズムの解明にも向けられており、癌化のメカニズムが特定遺伝子の~~発現~~と関与し得ることはたびたび議論されてきた。癌診断検査法として、血中癌マーカー等の検査、その他の癌化に関与する遺伝子産物等の同定などが既に行われていることは周知のとおりである。癌マーカーの中には、糖鎖に対する~~抗体~~も多く含まれる。とりわけ、癌遺伝子産物に対する免疫学的検定は、感度が高いという利点からたびたび採用されてきた。

【0004】

【表1】

表1 N-アセチルグルコサミン転移酵素とその基質特異性

正式名称	略称	結合形式	基質特異性	文献
N-acetylglucosaminyltransferase-I	GnT-I	β 1-2	Man α 1-3(Man α 1-6)Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4G3cNAc β 1-Asn	1
N-acetylglucosaminyltransferase-II	GnT-II	β 1-2	Man α 1-6(GlcNAc β 1-2)Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4G3cNAc β 1-Asn	2
N-acetylglucosaminyltransferase-III	GnT-III	β 1-4	GlcNAc β 1-2)Man α 1-6(GlcNAc β 1-2)Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4G3cNAc β 1-Asn	3
N-acetylglucosaminyltransferase-IV	GnT-IV	β 1-4	GlcNAc β 1-2)Man α 1-6(GlcNAc β 1-2)Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4G3cNAc β 1-Asn	4
N-acetylglucosaminyltransferase-V	GnT-V	β 1-6	GlcNAc β 1-2)Man α 1-6(GlcNAc β 1-2)Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4G3cNAc β 1-Asn	5
N-acetylglucosaminyltransferase-VI	GnT-VI	β 1-4	GlcNAc β 1-2)Man α 1-6(GlcNAc β 1-2)Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4G3cNAc β 1-Asn	6
β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase	iGnT	β 1-3	-GlcNAc β 1-4G3cNAc β 1-Asn	6
β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase-3	β 3GnT3	β 1-3	Gal β 1-4GlcNAc β 1-R	7
β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase-4	β 3GnT4	β 1-3	Gal β 1-3GalNAc-O-S/T	8
β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase-5	β 3GnT5	β 1-3	Gal β 1-4(GlcNAc β 1-3Gal β 1-4)n-R	9
β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase-6	β 3GnT6	β 1-3	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4-Cer	10
β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase-7	β 3GnT7	β 1-3	GalNAc-O-S/T	11
β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase	Fringe	β 1-3	Gal β 1-4(GlcNAc β 1-3Gal β 1-4)n-Cer	12
β 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase	IGnT	β 1-6	C2.X.X-G-G-(Glc-O)S/T-C3	13
Core 1 β 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase-I	C2GnT-I	β 1-6	GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R	14
Core 2 β 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase-II	C2GnT-II	β 1-6	Gal β 1-3GalNAc-O-S/T	15
Core 2 β 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase-III	C2GnT-III	β 1-6	Gal β 1-3GalNAc-O-S/T	16
α 1,4-N-acetylglucosaminyltransferase	α 4GnT	α 1-4	Gal β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)GalNAc-R	17
peptide β N-acetylglucosaminyltransferase	OGT	O	Y.S.D.S.P.S.T.S.T	18
				19

イメージデータ (N-アセチルグルコサミン転移酵素とその基質特異性)

【0005】

【非特許文献1】

J. Biol. Chem., 250(9): 3303-9 (1975)

【非特許文献2】

J. Biochem. Cell Biol., 61(9): 1049-1066 (1983)

【非特許文献3】

J. Biol. Chem., 257(17): 10235-10242 (1982)

【非特許文献4】

J. Biol. Chem., 258(10): 6162-73 (1983)

【非特許文献5】

J. Biol. Chem., 257(22): 13421-7 (1982)

【非特許文献6】

J. Biol. Chem., 275(42): 32598-602 (2000)

【非特許文献7】

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96(2): 406-11 (1999)

【非特許文献8】

Cell, 105(7): 957-69 (2001)

【非特許文献9】

J. Biol. Chem., 276: 3498-507 (2001)

【非特許文献10】

J. Biol. Chem., 276(25): 22032-40 (2001)

【非特許文献11】

Biol. Chem., 277(15): 12802-9 (2002)

【非特許文献12】

Biochem. Biophys. Res. Commun., 294(4): 842-8 (2002)

【非特許文献13】

J. Biol. Chem., 275(6794): 411-5 (2000)

【非特許文献14】

J. Biol. Chem., 259(21): 13385-90 (1984)

【非特許文献 1 5】

J. Biol. Chem., 255(23): 11253-61 (1980)

【非特許文献 1 6】

J. Biol. Chem., 274(5): 3215-21 (1999)

【非特許文献 1 7】

J. Biol. Chem., 275(15): 11106-13 (2000)

【非特許文献 1 8】

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96(16): 8991-6 (1999)

【非特許文献 1 9】

J. Biol. Chem. 465(5): 2563-2568 (1990)

【 0 0 0 6】

【表 2】

正式名	略称	結合形式	基質特異性	文献
β 1,4-galactosyltransferase-1	β 4GalT-1	β 1-4	GlcNAc β 1-R, Glc α 1-R	20
β 1,4-galactosyltransferase-2	β 4GalT-2	β 1-4	Xyl β 1-O-S/T	21
β 1,4-galactosyltransferase-3	β 4GalT-3	β 1-4	GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Ceramide	21
β 1,4-galactosyltransferase-4	β 4GalT-4	β 1-4	GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Ceramide	22
β 1,4-galactosyltransferase-5	β 4GalT-5	β 1-4	Glc α 1-R	23
β 1,4-galactosyltransferase-6	β 4GalT-6	β 1-4	Glc α 1-R	23
β 1,4-galactosyltransferase-7	β 4GalT-7	β 1-4	Xyl β 1-O-S/T	23
β 1,3-galactosyltransferase-1	β 3GalT-1	β 1-3	GlcNAc β 1-R	24
β 1,3-galactosyltransferase-2	β 3GalT-2	β 1-3	GlcNAc β 1-R	25
β 1,3-galactosyltransferase-4	β 3GalT-4	β 1-3	GlcNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1Ceramide	25
β 1,3-galactosyltransferase-5	β 3GalT-5	β 1-3	GlcNAc β 1-R	26
β 1,3-galactosyltransferase-6	β 3GalT-6	β 1-3	Gal β 1-4Xyl β 1-O-S/T	27
core 1 galactosyltransferase-1	C1GalT-1	β 1-3	GlcNAc β 1-O-S/T	28
core 1 galactosyltransferase-2	C1GalT-2	β 1-3	GlcNAc β 1-O-S/T	29

アンダーラインの糖に対してガラクトースを転移する。

酵素 (ガラクトース転移酵素とその基質特異性)

【0007】

【非特許文献 20】

J. Acad. Sci. U.S.A. 59, 491-7 (1968)

【非特許文献 21】

J. Biol. Chem., 19, 272(51), 31979-91 (1997)

【非特許文献 2 2】

J. Biol. Chem., 25, 273(52), 34843-9 (1998)

【非特許文献 2 3】

Glycobiology, 8(5), 517-26 (1998)

【非特許文献 2 4】

J. Biol. Chem., 25, 258(16), 9893-8 (1983)

【非特許文献 2 5】

J. Biol. Chem., 22, 273(21), 12770-8 (1998)

【非特許文献 2 6】

J. Biol. Chem., 30, 274(18), 12499-507 (1999)

【非特許文献 2 7】

J. Biol. Chem., 21, 276(51), 48189-95 (2001)

【非特許文献 2 8】

J. Biol. Chem., 4, 277(1), 178-86 (2002)

【非特許文献 2 9】

J. Biol. Chem., (2002), in press

【非特許文献 3 0】

Kobata A., Eur. J. Biochem. 15, 209(2), 483-501, 1992

【非特許文献 3 1】

Santer U.V. et al., Cancer Res., Sep, 44(9), 3730-5, 1984

【非特許文献 3 2】

Taniguchi N., Biochim. Biophys. Acta., 1455(2-3), 287-300, 1999

【0 0 0 8】

【~~発明が解決しようとする課題~~】

上述のように癌化に何らかの関与を持つ遺伝子産物の同定により、癌診断上有用な癌マーカーが提供されると期待されている。なかでも、癌化検定に際して転写産物中に見出される核酸を指標とすることができれば、その最終産物、例えばタンパク質の機能解明を待つまでもなく、特定遺伝子の転写産物の同定のみで十

分に癌化検定に有用な指標を提供できる。特に核酸の同定は、DNAマイクロアレイ上で行うこともできるし、微量でもそれをPCRで増幅して定量することも可能であるから、免疫学的検定法にはない利点も有する。

【0009】

他方、生体内での糖鎖の働きが注目されているが、生体内での糖鎖合成の解析は十分に進んでいるとは言えない。糖鎖合成のメカニズム、生体内での糖合成の局在が十分に解析されていないことも一因である。糖鎖合成のメカニズムを解析するに当たっては、糖鎖合成酵素、特に糖転移酵素を解析し、その酵素を使ってどのような糖鎖が生成されるのかを分析する必要がある。そのために新たな糖転移酵素を見つけだし、その機能を解析することについての要請も高まっている。

上記課題に鑑み、本発明の目的は、癌化に伴ってその転写レベルが有意に変化する癌マーカー核酸、これを標的とした癌化検定用の核酸、及び該核酸を用いた癌化の検定方法を提供することにある。

本発明の別の目的は、上記癌化の指標として注目される特定遺伝子の解析に伴い、ヒトの新規な糖転移酵素をコードする核酸、及び該新規な糖転移酵素を提供することにある。

本発明のまた別の目的は、該核酸を宿主細胞内で発現する形質転換体、さらに、当該形質転換体を生育させて、当該タンパク質を単離する方法を提供することにもある。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、目的とする酵素と類似した作用を有する酵素遺伝子の塩基配列を基に、配列同一性が高いと思われる目的とする核酸の単離と精製を試みた。具体的には、まず、公知の糖転移酵素である β 1, 3-N-アセチルグルコサミン糖転移酵素の配列をクエリーとしてBLAST検索を行い、その結果、相同性を有する配列としてゲノム配列 (GenBank No. AC011462) を見出した。

さらに、PCRでタンパク質の遺伝子のクローニングに成功し、その塩基配列 (配列番号1) 及び推測アミノ酸配列 (配列番号2) を決定した。配列番号1の塩

基配列を有する遺伝子を含む遺伝子、配列番号2のアミノ酸配列を有するタンパク質をG9タンパク質と命名した。これにより、当該核酸がコードするタンパク質が新規な糖転移酵素であることを発見し、さらに、癌化した組織において、前記核酸の発現の有無又はその発現量が健常組織と異なることを見出し、本発明を完成した。

【0011】

すなわち、本発明は、配列番号1に記載の塩基配列又はその相補的な塩基配列にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸に関する。

本発明の核酸は、好ましくは、配列番号1に記載の塩基配列中の少なくとも15個の連続する塩基配列又はその相補的な塩基配列からなる。

本発明の核酸は、典型的にはプローブまたはプライマーである。また本発明の核酸は、癌マーカーでもあり得る。

【0012】

本発明はまた、生物試料の癌化を検定する方法であって、

(a) 前記何れかに記載の核酸を使用して、生物試料中の該核酸の転写レベルを測定し；そして

(b) 該生物試料中の該核酸の転写レベルが、対照の健常生物試料のそれを有意に上回る場合に、該生物試料が癌化していると判断することを含む方法に関する。

本発明による検定方法の好ましい態様によれば、その生物試料の癌化を検定する方法は、

(a) 前記何れかに記載の核酸を標識されたプローブとして使用し、これを生物試料にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で接触させ、ここでハイブリダイズした核酸の標識からのシグナルに基づき該生物試料中の該核酸の転写レベルを測定し；そして

(b) 該生物試料中の核酸の転写レベルが、対照の健常生物試料中のそれを有意に上回る場合に、該生物試料が癌化していると判断することを含む。

【0013】

本発明による検定方法の好ましい他の態様によれば、その生物試料の癌化を検定する方法は、

(a) 標識された前記プライマーを使用して、生物試料について核酸増幅を行い、且つ該核酸増幅産物の量を測定し；そして

(b) の該核酸増幅産物の量が、対照の健常生物試料中のそれを有意に上回る場合に、該生物試料が癌化していると判断することを含む。

【0014】

さらに、本発明による検定方法の別の態様によれば、本発明の核酸を使用して、癌治療に関する処置の効果を検査することもできる。

本発明により癌治療に関する処置の有効性を検査する方法は、癌治療に関する処置の有効性を検査する方法であって、癌治療のための処置がなされた生物試料中の前記核酸の転写レベルを、本発明によるいずれかの核酸を使用して測定し、~~該測定値を~~、該処置前又は未処置のそれと比較することにより、該生物試料への該処置が有効であるか否かを判断することを含む方法である。

【0015】

本発明による上記処置の有効性を検査する方法の好ましい態様には、既に癌化している前記生物試料を使用し、癌治療のための処置がなされた該生物試料中の前記核酸の転写レベルが、該処置前又は未処置のそれを有意に下回る場合に、該生物試料への該処置が有効であると判断することを含む方法が含まれる。

なお、上記処置の有効性を検査する方法を適用し得る生物試料には、非ヒトモデル動物のin vivo生物試料のほか、組織、細胞等（ヒトを含む）由来のin vitro生物試料が含まれる。また、本発明による上記各方法を適用し得る生物試料は、典型的には大腸由来の試料である。

【0016】

本発明の他の側面において、配列番号1の塩基配列は、既知の遺伝子であるヒトの β 3GlcNAc転移酵素1及び β 3Gal転移酵素6と31%の相同性があり、保
~~有されている~~モチーフは β 3Gal転移酵素に近い。また、マウスの β 3GlcNAc転
移酵素1とは60%の相同性がある。さらに、配列番号2の推測アミノ酸配列は

、そのN末端に糖転移酵素の特徴である疎水膜貫通領域を有する。

【0017】

上記の観点から、配列番号1の核酸配列は、N-アセチル-D-グルコサミン残基又はD-ガラクトース残基を転移させて、 β 1, 3結合で糖鎖を合成するヒトの新規な糖転移酵素をコードしていると推測される。他方、経験的な知見からは、N-アセチル-D-ガラクトサミン残基を転移させ、 β 1, 3結合で糖鎖を合成するヒトの新規な糖転移酵素をコードしている可能性もある。

【0018】

また配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質は、上記のような新規な糖転移酵素の活性を有すると推定される。この新規なタンパク質のアミノ酸配列及びそれをコードする核酸を提供することは、当該技術分野におけるこれらの多様な必要性を満たすのに貢献するであろう。

【0019】

すなわち、本発明は、糖供与体基質からの糖残基を糖受容体基質に β 1, 3結合で転移する糖転移酵素タンパク質をコードする、配列番号1に記載の塩基配列を有する核酸にも関する。典型的な糖供与体基質は、UDP-GlcNAc、UDP-Gal、又はUDP-GalNAcであり、それぞれの場合に典型的な糖受容体基質は、GlcNAc、Gal又はGalNAc受容体基質である。

【0020】

本発明の糖転移酵素をコードする核酸の一態様では、該核酸はDNAである。また、この本発明に関する好ましい態様によれば、前記核酸を含むベクター、該ベクターを含む形質転換体、並びに、該ベクターを含む形質転換体を生育させ、前記糖転移酵素タンパク質を発現させ、その生廃物から前記糖転移酵素を回収することを含む、該糖転移酵素の製造方法も提供される。

さらに、本発明は、配列番号2のアミノ酸配列を有する糖転移酵素タンパク質、及び該糖転移酵素タンパク質を認識する抗体をも提供するであろう。

また、本発明の核酸が新規糖転移酵素タンパク質をコードするとの知見は、癌組織における該糖転移酵素タンパク質の発現量が健常組織よりを上回っていることを示唆する。よって、生物試料中に発現している本発明のタンパク質を検出又

は定量し、対照の健常生物試料中のそれと比較することにより、該生物試料の癌化を検定することも可能であろう。

【0021】

したがって本発明は、生物試料の癌化を検定する方法であって、

(a) 生物試料中の本発明の新規糖転移酵素タンパク質を検出又は定量し；そして

(b) 生物試料中の前記糖転移酵素タンパク質の定量値が、対照の正常な生物試料中の前記糖転移酵素タンパク質のそれを有意に上回る場合には癌化していると判断する工程を含む方法にも関する。

ここで新規糖転移酵素タンパク質を検出するためには、糖転移酵素タンパク質を特異的に認識する抗体を使用することが例示される。

【0022】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を発明の実施の形態により詳説する。

(1) 癌化に関する本発明の核酸

本発明者らは、配列番号1に記載の塩基配列を有する核酸が発現していない健常組織、例えばヒト大腸癌組織では、その癌化により該核酸の発現が確認されること、及び、配列番号1に記載の塩基配列を有する核酸が一般に発現している健常組織、例えば大腸癌患者の末梢血ではその癌化により該核酸の発現量が有意に増大することを発見した。

したがって、配列番号1の塩基配列又はその相補的配列からなる核酸は、生物試料中の転写産物に対する検査において有用な癌マーカーとして着目される。本発明によれば、この癌マーカー核酸にストリンジェントな条件下で特異的にハイブリダイズし得る核酸が提供される。

【0023】

本発明によるプライマー又はプローブは、典型的には、配列番号1の塩基配列を有する核酸に由来する天然のDNAフラグメント、配列番号1の塩基配列を有するように合成されたDNAフラグメント、又はそれらの相補鎖である。

特に該癌マーカー核酸は、BLAST検索を介して突き止めたもので、それは

構造遺伝子をコードするmRNAとして転写されている。通常、そのORF全長またはその部分が試料中に存在し得る。この見地から、該核酸を標的とするプライマー又はプローブとして、配列番号1の塩基配列のORF全域から、所望の標的配列を選択することができる。本発明のプライマー又はプローブは、配列番号1の塩基配列中の部分配列であることもできる。

上記のようなプライマー又はプローブを用いて、後述のように生物試料中の該標的核酸を検出し及び／又は定量することができる。また、ゲノム配列等も標的となりうるので、本発明の核酸を、医学研究用又は遺伝子治療用のアンチセンスプライマーとして提供されることもできる。

【0024】

本発明のプローブ

本発明の核酸をプローブとして使用する場合、その核酸は、配列番号1の塩基配列から選ばれる15塩基以上、好ましくは20塩基以上のオリゴヌクレオチド若しくはその相補鎖であるか、或いは、最長でそのORF領域（塩基番号1-1191）の全長、即ち、1191塩基のcDNA若しくはその相補鎖である。

特に本発明のプローブは医学研究用の試薬又は診断薬として広く有用である。一般に核酸はあまり分子量大きいと取り扱いが困難となり、この見地からは、プローブの好ましい塩基長として、50～500塩基、より好ましくは60～300塩基も例示される。

なお、採用される塩基長及びハイブリダイズ条件等に依存するが、比較的短鎖のオリゴヌクレオチドプローブは、配列番号1の塩基配列又はその相補的な塩基配列と1又は数個の塩基、特に1又は2塩基程度の不一致があってもプローブとしての機能を果たし得る。また、比較的長鎖のcDNAプローブは、配列番号1の塩基配列又はその相補的な塩基配列と50%以下、好ましくは20%以下の不一致があっても、プローブとしての機能を果たし得る。

【0025】

また、本発明の核酸が合成オリゴヌクレオチドである場合、その塩基数は15塩基以上、好ましくは20塩基以上である。合成オリゴヌクレオチドの場合、その塩基長及び採用されるハイブリダイズ条件に依存するが、配列番号1に記載し

た塩基配列又はその相補的な塩基配列と1又は数個の塩基、特に1又は2塩基程度の不一致があってもプローブとしての機能を果たし得る。

本発明によるオリゴヌクレオチドプローブは、15塩基長もあれば、ストリンジントな条件下で該標的核酸に対して特異的にハイブリダイズし得ることを理解されるべきである。当業者は、オリゴヌクレオチドプローブ設計に関する公知の各種ストラテジーに従い、配列番号1の塩基配列から適切な少なくとも15塩基の部分配列を選択することができる。また、配列番号2のアミノ酸配列情報は、プローブとして適切と思われるユニークな配列を選定するのに役立つであろう。

【0026】

ここでストリンジントな条件下とは、中程度又は高程度なストリンジントな条件下でハイブリダイズすることを意味する。具体的には、中程度のストリンジントな条件は、例えば、DNAの長さに基づき、一般の技術を有する当業者によって、容易に決定することが可能である。基本的な条件は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第3版、Vol.1、7.42-7.45 Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001に示され、そしてニトロセルロースフィルターに関し、5×SSC、0.5% SDS、1.0 mM EDTA (pH8.0)の前洗浄溶液、約40-50℃での、約50%ホルムアミド、2×SSC-6×SSC（又は約42℃での約50%ホルムアミド中の、スターク溶液 (Stark's solution) などの他の同様のハイブリダイゼーション溶液）のハイブリダイゼーション条件、および約60℃、0.5×SSC、0.1% SDSの洗浄条件の使用が含まれる。高ストリンジントな条件もまた、例えばDNAの長さに基づき、当業者によって、容易に決定することが可能である。一般的に、こうした条件は、中程度にストリンジントな条件よりも高い温度及び／又は低い塩濃度でのハイブリダイゼーション及び／又は洗浄を含み、例えば上記のようなハイブリダイゼーション条件、及びおよそ68℃、0.2×SSC、0.1% SDSの洗浄を伴うと定義される。当業者は、温度および洗浄溶液塩濃度は、プローブの長さ等の要因に従って、必要に応じて調整可能であることを認識するであろう。

【0027】

上記のように、当業者であれば、当該技術分野において公知の各種プローブ設

計法及びハイブリダイゼーション条件に関する技術常識、並びに通常用いられる実験手段を通じて得られるであろう経験則を基に、選択されたプローブに適切な中程度又は高程度にストリンジェントな条件を容易に見つけ出し、実施することができる。

また、本発明のプローブには、標的配列とハイブリダイズした該プローブを検出または確認するために、蛍光標識、放射標識、ビオチン標識等の標識を付した標識プローブが含まれる。本発明による標識プローブの一例は、配列番号6の塩基配列（配列番号1中の塩基番号485-502の相補鎖に相当する）からなるオリゴヌクレオチドである。この標識プローブは、標的核酸のPCR産物を確認又は定量するために使用し得る。また、本発明の標識プローブは、診断用DNAプローブキット等に組み込まれてもよいし、DNAマイクロアレイ等のチップ上に固定されてもよい。

【0028】

本発明のプライマー

本発明の核酸をプライマーとして使用する場合、その核酸は、オリゴヌクレオチドである。具体的には、配列番号1の塩基配列のORF領域から以下の条件を満たすように2つの領域を選択し：

- 1) 各領域の長さが15塩基以上、好ましくは18塩基以上、より好ましくは21塩基以上であり、50塩基以下であること；
- 2) 各領域中のG+Cの割合が40-70%であること；

選択された2つの領域と同じ塩基配列若しくはそれら領域に相補的な塩基配列を有する一本鎖DNAを製造してもよいし、その塩基配列に対する結合特異性を失わないように修飾した上記一本鎖DNAを製造してもよい。本発明のプライマーは、配列番号1のORF領域中の部分配列と完全に相補的な配列を有することが好ましいが、1または2塩基の不一致があっても差し支えない。

本発明による一対のプライマーの例は、配列番号4に記載の塩基配列（配列番号1中の塩基番号450-469の相補鎖に相当する）からなるオリゴヌクレオチド、及び配列番号5に記載の塩基配列（配列番号1中の塩基番号531-549の相補鎖に相当する）からなるオリゴヌクレオチドである。

PCRにより増幅させた標的核酸を定量するには、使用された一対のプライマーの間に位置する塩基配列から選択されるプローブを使用できる。PCR産物を検出するための標識プローブの例は、配列番号6に記載の塩基配列（配列番号1中の塩基番号485-502の相補鎖に相当する）からなるオリゴヌクレオチドである。

【0029】

(2) 本発明による癌化の検査方法

本発明の癌化検査方法により、生物試料の転写産物中の標的核酸の転写レベルを測定することができる。その測定の結果は、対照の健常生物試料についての結果と比較される。それら結果の間に有意な差違がある場合に、該生物試料は癌化した組織であると判断することができる。

また、この検定法において、対照とされる健常組織についての検出結果は、健常生物試料に関する既知データを基に予め一般化された閾値を、対照の検出結果として用いても差し支えない。例えば、末梢血の検査のように同一患者から健常組織を得られない場合は、健常者から測定された平均値との比較が行われる。

ここで癌化していると判断されるべき有意な差違とは、例えばヒト大腸癌患者からの末梢血におけるように健常組織で該標的核酸が発現しているなら、被検組織中の該標的核酸の実質的な存在（即ち、有意な濃度）が確認されること、或いは、例えば大腸癌組織におけるように健常組織で一般に発現しているなら、被検組織中の該核酸濃度が健常組織のそれを有意に上回っていること、好ましくは被検組織の健常組織に対するその濃度比で1.5倍以上、より好ましくは2倍以上であることをいう。

本発明による癌化検査方法には、典型的にはハイブリダイゼーション検定法及びPCR法が含まれる。

【0030】

ハイブリダイゼーション検定法

本発明で使用し得るハイブリダイゼーション検定法には、例えば、生物試料から抽出された転写産物に対するサザンブロット、ノーザンブロット、ドットブロット、~~スリット~~、~~スリット~~コロニーハイブリダイゼーション法等のような当業者に周知である各

種ハイブリダイゼーション検定法が含まれる。

また、標的核酸の転写量や健常組織との差違に依存するが、当該標的核酸の定量又は検出レベルの増幅が必要とされる場合、ドットプロット若しくはコロニーハイブリダイゼーション等の定量的ハイブリダイゼーション検定法、或いはそれに免疫学的検定法を組み合わせた公知の検査法を使用してもよい。

典型的なハイブリダイゼーション検定法によれば、生物試料から抽出された検核酸またはその増幅物が固相化され、標識プローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズさせ、洗浄後、固相に結合された標識が測定される。

生物試料からの転写産物の抽出及び精製には、当業者に知られているあらゆる方法を適用し得る。生物試料から精製されてハイブリダイゼーション検定法に供されるものは、典型的には、生物試料の転写産物総体からの cDNA である。但し、当該標的核酸の実質的な検出のみをもって癌化とみなせる場合、すなわち健常組織では標的核酸が発現していないと見られる場合の被検組織については、in situ ハイブリダイゼーションのような、転写産物の精製等が不要な検査法を使用することが臨床検査上は実用的であろう。

【0031】

核酸増幅による検査法

本発明によって「本発明核酸の塩基配列」が開示されたため、当業者であれば目的とする本発明の核酸又は調製すべきその一部領域の、両端に位置する塩基配列を基に適宜プライマーを作成し、それを用いて核酸増幅反応 (PCR) などによって目的の領域を増幅して調製することが容易である。

ここで、核酸増幅反応は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) [Saiki R. K., et al., Science, 230, 1350-1354 (1986)]、ライゲース連鎖反応 (LCR) [Wu D. Y., et al., Genomics, 4, 560-569 (1989); Barringer K. J., et al., Gene, 89, 117-122 (1990); Barranger K. J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 189-193 (1991)] 及び転写に基づく増幅 [Kwoh D. Y., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1173-1177 (1989)] 等の温度循環を必要とする反応、並びに鎖置換反応 (SDA) [Walker G. T., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 392-396 (1992); Walker G. T., et al., Nuc. Acids Res., 20, 1691-1696 (1992)]

2)]、自己保持配列複製 (SSR) [Guatelli J. C., Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 87, 1874-1878 (1990)] および Q β レプリカーゼシステム [リザイルディら、BioTechnology 6, p.1197-1202 (1988)] 等の恒温反応を含む。また、欧州特許第0525882号に記載されている標的核酸と変異配列の競合増幅による核酸配列に基づく増幅 (Nucleic Acid Sequence Based Amplification: NASABA) 反応等も利用可能である。好ましくはPCR法である。

【0032】

転写産物中の標的核酸は、例えば、本発明の標的核酸から選ばれる一対のプライマーを使用したPCR法を用いて検出することができる。一般に、PCRのような核酸増幅法自体は、当該技術分野において周知であり、そのための試薬キットおよび装置も市販されているので容易に行うことができる。

本発明のプライマー対を用い、そして上記被検核酸を鋳型として用い、PCRによる核酸増幅法を行うと、存在する被検核酸が増幅されるのに対し、検体中に被検核酸が含まれない場合には増幅が起きないので、増幅産物の存在を確認することにより検体中に被検核酸が存在するか否かを知ることができるし、増幅産物を定量することにより被検核酸の転写レベル、すなわち濃度を知ることにもできる。PCRの所定サイクル数の繰り返しにより被検核酸は所望の濃度まで増幅されるであろう。また、健常組織中の該核酸も同様にして測定される得る。また、同一組織等に広く一般的に存在する遺伝子の核酸、例えばグリセルアルデヒド-3リン酸-脱水素酵素 (GAPDH)、 β -アクチンをコードする核酸を対照として利用するとよい。

【0033】

被検核酸は、被検組織又は細胞などの生物試料から抽出された転写産物としてのmRNA総体でも、mRNAから逆転写したcDNA総体でもよい。被検核酸であるmRNAを増幅する場合には、上記一対のプライマーを用いたNASBA法(3SR法、TMA法)を採用してもよい。NASBA法自体は周知であり、そのためのキットも市販されているので、上記一対のプライマーを用いて容易に実施することができる。

PCR法で得られた増幅産物の検出又は定量は、増幅後の反応溶液を電気泳動し、バンドをエチジウムブロミド等で染色する方法や、電気泳動後の増幅産物をナ

イロン膜等の固相に不動化し、被検核酸と特異的にハイブリダイズする標識プローブ、例えば、配列番号6に記載の標識プローブをハイブリダイズさせ、洗浄後、該標識を検出することにより行うことができる。

また、被検組織と健常組織との間でそれら標的核酸の「濃度」を比較する場合、定量的PCR法を使用することが好ましく、それにはキネティックス分析のためのRT-PCR法、定量的リアルタイムPCR法が含まれる。先だって精製される標的核酸はmRNAであるから、定量的リアルタイムRT-PCR法は特に好適である。但し、本検定法における核酸の定量は、定量的PCR法に限定されるものではなく、PCR産物に対して、上述のプローブを用いたノーザンプロット、ドットプロット、DNAマイクロアレイのような公知の他のDNA定量法を適用し得る。

また、クエンチャー蛍光色素とレポーター蛍光色素を用いた定量的RT-PCRを行うことにより、検体中の標的核酸の量を定量することも可能である。特に定量的RT-PCR用のキットも市販されているので、容易に行うことができる。さらに、電気泳動バンドの強度に基づいて標的核酸を半定量することも可能である。

【0034】

癌治療効果に関する検定方法

上記本発明による癌化検定法は、癌治療効果を検査する方法として使用することもできる。検査対象は、その癌治療効果を検査すべき処置の効果であり、癌化した細胞や組織又は発癌実験モデル動物から得られる腫瘍組織等への処置の効果である。そのような処置には、抗癌剤の投与のほか、放射線治療等のあらゆる処方が含まれる。癌化した生物試料へ又は実験モデル動物の病巣へ処置が行われる。

本発明による癌治療効果の検定法によれば、目的の処置がなされた生物試料中の前記標的核酸の転写レベルが、処置前又は未処置の場合と比較される。また、処置後に転写レベルを追跡してもよい。当該処置に起因して、転写レベルが有意に下がるか、又は仕込まれた上昇が有意に抑制されるなら、該処置はその癌の治療に有効であると評価できる。

この種の検査には、癌化した組織に抗癌剤の候補物質を与えてそれが効くか否か、特に実験モデル動物中の病変組織等にそれが効くか否か、癌患者にとって新

たな候補抗癌剤が有効であるか否か等の判断が含まれる。また逆に、発癌するように仕組まれた実験モデル動物において発癌が抑制されるか否か、つまり転写レベルの予期される上昇が有意に抑制されたか否かも評価の対象となる。

【0035】

本明細書において、核酸の「転写レベル」又は「転写量」というときは、一定量の生物試料中の転写産物に由来する当該核酸の存在量を示す。また、核酸は定量的のために増幅され又は標識のシグナルレベルを増幅され得るのであるから、測定された核酸の量は、増幅された量又は増幅されたシグナルレベルとしても記述され得る。

【0036】

本明細書において、「被検核酸」又は「標的核酸」というときは、*in vivo*又は*in vitro*のいずれかを問わず、mRNAはもちろんのこと、mRNAを鋳型にして得られるあらゆるタイプの核酸が含まれる。

本明細書において、「生物試料」というときは、器官、組織及び細胞、並びに実験動物由来の器官、組織及び細胞等を示すが、好ましくは組織であり、具体的には、食道、胃、脾臓、肝臓、腎臓、十二指腸、小腸、大腸、直腸、結腸が例示される。好ましくは大腸、直腸、及び結腸であり、より好ましくは大腸である。また、本明細書において使用される用語「測定」には、検出、増幅、定量、および半定量的のいずれもが含まれる。また、本発明の核酸の用途には遺伝子治療も含まれる。

【0037】

本発明の検定方法は、上記の通り、生物試料の癌化を検定するものであり、ここで「癌化の検定」という用語には、生物試料が発癌しているか否かについての検定のほか、悪性度が高いか否かについての検定も含まれ、医療における癌の診断、治療に応用することができる。本明細書において使用される用語「癌」には、典型的には、悪性腫瘍全般をいい、該悪性腫瘍による疾病状態を含む。本発明検定方法は、限定されるわけではないが、食道癌、胃癌、脾臓癌、肝臓癌、腎臓癌、十二指腸癌、小腸癌、大腸癌、直腸癌、及び結腸癌、好ましくは大腸癌、直腸癌、及び結腸癌であり、より好ましくは大腸癌の検定に適している。

【0038】

(2) 新規糖転移酵素をコードする本発明の核酸

本発明はまた、上述の核酸の発見に基づき、新規糖転移酵素タンパク質の全長または断片をコードする核酸を提供する。

本発明の新規糖転移酵素をコードする核酸は、配列番号1に記載の塩基配列又はそれに相補的な塩基配列からなる核酸である。また、該核酸がコードするアミノ酸配列と縮重により同一のアミノ酸配列をコードする核酸も本発明に含まれる。該核酸は、例えば癌化検定法への利用に適した核酸であることは既に述べた通りである。

【0039】

本発明の新規糖転移酵素をコードする核酸は、一本鎖及び二本鎖型両方のDNA、及びそのRNA相補体も含む。DNAには、例えば、天然由来のDNA、組換えDNA、化学結合したDNA、PCRによって増幅されたDNA、及びそれらの組み合わせが含まれる。但し、ベクターや形質転換体の調製時に安定であるとの観点から、DNAであることが好ましい。

本発明の核酸は、例えば以下の方法により調製することが可能である。

まず、公知の糖転移酵素である β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素の配列をクエリーとしてBLAST検索を行い、その結果、相同性を有する配列としてゲノム配列 (GenBank No. AC011462) を見出すことができる。この相補配列又はその一部を利用して、ハイブリダイゼーションや核酸増幅反応等の遺伝子工学の基本的手法を用いてcDNAライブラリーなどから常法に従って核酸増幅反応を行うことで、本発明の核酸を調製することができる。例えば、PCR産物として約1.1kbpのDNA断片が得られるので、これを例えばアガロースゲル電気泳動等の分子量によりDNA断片を篩い分ける方法で分離し、特定のバンドを切り出す方法等の常法に従って単離することができる。

【0040】

該核酸のアミノ酸配列 (配列番号2) によれば、N末端に膜貫通領域を有することが予測されるので、この膜貫通領域を有しないポリペプチドをコードする塩基配列の領域を調製するとにより、可溶化形態のポリペプチドをコードする本発

明の核酸も得ることができる。

【0041】

上記ハイブリダイゼーションや核酸増幅反応等を使用してクローニングされる相同な核酸は、配列番号1に記載の塩基配列に対して少なくとも50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、さらになお好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の同一性を有する。

【0042】

同一性パーセントは、視覚的検査および数学的計算によって決定することが可能である。あるいは、2つの核酸配列の同一性パーセントは、Devereuxら, Nucl. Acids Res. 12: 387, 1984に記載され、そしてウイスコンシン大学遺伝学コンピュータグループ(UWGCG)より入手可能なGAPコンピュータプログラム、バージョン6.0を用いて、配列情報を比較することによって、決定可能である。このプログラムの好ましいデフォルトパラメーターには: (1) ヌクレオチドに関する単一(unary)比較マトリックス(同一に対し1および非同ーに対し0の値を含む)、並びにSchwartz及びDayhoff監修, Atlas of Protein Sequence and Structure, pp.353-358, National Biomedical Research Foundation, 1979に記載されるような、Gribskov及びBurgess, Nucl. Acids Res. 14: 6745, 1986の加重比較マトリックス; (2) 各ギャップに対する3.0のペナルティおよび各ギャップ中の各記号に対しさらに0.10のペナルティ; 及び(3) 末端ギャップに対するペナルティなし、が含まれる。当業者に用いられる、配列比較の他のプログラムもまた、使用可能である。

【0043】

(3) 本発明のベクター及び形質転換体

本発明によれば、単離した上記核酸を含む組換えベクターが提供される。プラスミド等のベクターに該核酸のDNA断片を組み込む方法としては、例えば、Sambrook, J.ら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, 1.1 (2001)に記載の方法などが挙げられる。簡便には、市販のライゲーションキット(例えば、宝酒造製等)を用いることもできる。こ

のようにして得られる組換えベクター（例えば、組換えプラスミド）は、宿主細胞（例えば、大腸菌DH5 α 、TB1、LE392、又はXL-LE392又はXL-1Blue等）に導入される。

【0044】

プラスミドを宿主細胞に導入する方法としては、Sambrook, J.ら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, 16.1 (2001)に記載の塩化カルシウム法または塩化カルシウム／塩化ルビジウム法、エレクトロポレーション法、エレクトロインジェクション法、PEGなどの化学的な処理による方法、遺伝子銃などを用いる方法などが挙げられる。

ベクターは、簡単には当業界において入手可能な組換え用ベクター（例えば、プラスミドDNA等）に所望の遺伝子を常法により連結することによって調製することができる。用いられるベクターの具体例としては、大腸菌由来のプラスミドとして、例えば、pDONR201、pBluescript、pUC18、pUC19、pBR322等が例示されるが、これらに限定されない。

当業者であれば制限末端は発現ベクターに適合するように適宜選択することが可能である。発現ベクターは、本発明の酵素を発現させたい宿主細胞に適したものを当業者であれば適宜選択することができる。このように本発明による発現ベクターは、上記核酸が目的の宿主細胞中で発現しうるように遺伝子発現に関与する領域（プロモータ領域、エンハンサー領域、オペレーター領域等）が適切に配列されており、さらに該核酸が適切に発現するように構築されていることが好ましい。また、発現ベクターの構築は、制限処理及び連結作業を必要としない、Gatewayシステム（インビトロジェン社）を用いることもできる。Gatewayシステムとは、PCR産物の方向性を維持したままクローニングができ、また、DNA断片を適切に改変した発現ベクターにサブクローニングを可能にした部位特異的な組換えを利用したシステムである。具体的には、PCR産物とドナーベクターとから部位特異的な組換え酵素であるBPクロナーゼによってエントリークローンを作成し、その後、このクローンと別の組換え酵素であるLRクロナーゼによって組換え可能なデスティネーションベクターにPCR産物を移入することにより、発現系に対応した発現クローンを調製するものである。最初にエントリーク

ローンを作成すれば、制限酵素やリガーゼで作業する手間の係るサブクローニングステップが不要である点を特徴の一つとする。

【0045】

発現ベクターの種類は、原核細胞及び／又は真核細胞の各種の宿主細胞中で所望の遺伝子を発現し、所望のタンパク質を生産する機能を有するものであれば特に限定されないが、例えば、大腸菌用発現ベクターとして、pQE-30、pQE-60、pMAL-C2、pMAL-p2、pSE420などが好ましく、酵母用発現ベクターとしてpYES2（サッカロマイセス属）、pPIC3.5K、pPIC9K、pA0815（以上ピキア属）、昆虫用発現ベクターとしてpFastBac、pBacPAK8/9、pBK283、pVL1392、pBlueBac4.5などが好ましい。

本発明の上記発現ベクターを宿主細胞に組み込めば、形質転換体を得ることができる。上記宿主細胞は、真核細胞（ほ乳類細胞、酵母、昆虫細胞等）であっても原核細胞（大腸菌、枯草菌等）であってもよい。本発明の形質転換体を得るための宿主細胞は、特に限定されず、さらに、または、ヒト（例えば、HeLa、293T、SH-SY5Y）、マウス（例えば、Neuro2a、NIH3T3）等由来の培養細胞でもよい。これらはいずれも公知であり、市販されているか（例えば、大日本製薬社）、あるいは公共の研究機関（例えば、理研セルバンク）より入手可能である。あるいは、胚、器官、組織若しくは非ヒト個体も使用可能である。

【0046】

ところで、本発明の核酸はヒトゲノムライブラリーから発見された核酸であるため、本発明においては真核細胞を本発明の形質転換体の宿主細胞として用いることより天然物に近い性質を有した「本発明酵素」が得られる（例えば糖鎖が付加された態様など）と考えられる。従って、「宿主細胞」としては真核細胞、特にほ乳類細胞を選択することが好ましい。ほ乳類細胞としては、具体的には、マウス由来、動物細胞としてはマウス由来、アフリカツメガエル由来、ラット由来、ハムスター由来、サル由来またはヒト由来の細胞若しくはそれらの細胞から樹立した培養細胞株などが例示される。また、宿主細胞としての大腸菌、酵母又は昆虫細胞は、具体的には、大腸菌（DH5 α 、M15、JM109、BL21等）、酵母（INVSc

1 (サッカロマイセス属)、GS115、KM71 (以上ピキア属) など)、昆虫細胞 (Sf 21、BmN4、カイコ幼虫等) などが例示される。

宿主細胞として細菌、特に大腸菌を用いる場合、一般に発現ベクターは少なくとも、プロモーター／オペレーター領域、開始コドン、所望のタンパク質をコードする遺伝子、終止コドン、ターミネーターおよび複製可能単位から構成される。

【0047】

宿主細胞として酵母、植物細胞、動物細胞または昆虫細胞を用いる場合には、一般に発現ベクターは少なくとも、プロモーター、開始コドン、所望のタンパク質をコードする遺伝子、終止コドン、ターミネーターを含んでいることが好ましい。またシグナルペプチドをコードするDNA、エンハンサー配列、所望の遺伝子の5'側および3'側の非翻訳領域、選択マーカー領域または複製可能単位などを適宜含んでいてもよい。

本発明のベクターにおいて、好適な開始コドンとしては、メチオニンコドン (ATG) が例示される。また、終止コドンとしては、常用の終止コドン (例えば、TAG、TGA、TAAなど) が例示される。

複製可能単位とは、宿主細胞中でその全DNA配列を複製することができる能力をもつDNAを意味し、天然のプラスミド、人工的に修飾されたプラスミド (天然のプラスミドから調製されたプラスミド) および合成プラスミド等が含まれる。好適なプラスミドとしては、E. coliではプラスミドpQE30、pET又はpCAL若しくはそれらの人工的修飾物 (pQE30、pET又はpCALを適当な制限酵素で処理して得られるDNAフラグメント) が、酵母ではプラスミドpYES2若しくはpPIC9Kが、また昆虫細胞ではプラスミドpBacPAK8/9等があげられる。

【0048】

エンハンサー配列、ターミネーター配列については、例えば、それぞれSV40に由来するもの等、当業者において通常使用されるものを用いることができる。

選択マーカーとしては、通常使用されるものを常法により用いることができる。例えばテトラサイクリン、アンピシリン、またはカナマイシンもしくはネオマ

イシン、ハイグロマイシンまたはスペクチノマイシン等の抗生物質耐性遺伝子などが例示される。

【0049】

発現ベクターは、少なくとも、上述のプロモーター、開始コドン、所望のタンパク質をコードする遺伝子、終止コドン、およびターミネーター領域を連続的かつ環状に適当な複製可能単位に連結することによって調製することができる。またこの際、所望により制限酵素での消化やT4 DNAリガーゼを用いるライゲーション等の常法により適当なDNAフラグメント（例えば、リンカー、他の制限酵素部位など）を用いることができる。

【0050】

本発明の発現ベクターの宿主細胞への導入〔形質転換（形質移入）〕は従来公知の方法を用いて行うことができる。

例えば、細菌（*E. coli*, *Bacillus subtilis*等）の場合は、例えばCohenらの方法〔*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 2110 (1972)〕、プロトプラスト法〔*Mol. Gen. Genet.*, 168, 111 (1979)〕やコンピテント法〔*J. Mol. Biol.*, 56, 209 (1971)〕によって、*Saccharomyces cerevisiae*の場合は、例えばHinnenらの方法〔*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 1927 (1978)〕やリチウム法〔*J. Bacteriol.*, 153, 163 (1983)〕によって、植物細胞の場合は、例えばリーフディスク法〔*Science*, 227, 129 (1985)〕、エレクトロポレーション法〔*Nature*, 319, 791 (1986)〕によって、動物細胞の場合は、例えばGrahamの方法〔*Virology*, 52, 456 (1973)〕、昆虫細胞の場合は、例えばSummerらの方法〔*Mol. Cell Biol.*, 3, 2156-2165 (1983)〕によってそれぞれ形質転換することができる。

【0051】

（4）本発明による酵素タンパク質の単離・精製

本発明は遺伝子工学的手法として、形質転換体を培養、生育させてその培養物、生育物から目的物質を単離・精製する手法が確立されている。

本発明に係る酵素タンパク質は、例えば、上記の如く調製された発現ベクターを含む形質転換体を栄養培地で培養することによって発現（生産）することができる。栄養培地は、宿主細胞（形質転換体）の生育に必要な炭素源、無機窒素源

もしくは有機窒素源を含んでいることが好ましい。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストラン、可溶性デンプン、ショ糖、メタノールなどが、例示される。無機窒素源もしくは有機窒素源としては、例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、アミノ酸、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などが例示される。また、所望により他の栄養素（例えば無機塩（例えば、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム）、ビタミン類、抗生物質（例えばテトラサイクリン、ネオマイシン、アンピシリン、カナマイシン等）など）を含んでいてもよい。培養は、当業界において知られている方法により行われる。培養条件、例えば温度、培地のpH及び培養時間は、本発明に係るタンパク質が大量に生産されるように適宜選択される。

【0052】

本発明に係るタンパク質は、上記培養により得られる培養物より以下のようにして取得することができる。すなわち、本発明に係るタンパク質が宿主細胞内に蓄積する場合には、遠心分離やろ過などの操作により宿主細胞を集め、これを適当な緩衝液（例えば濃度が10～100mM程度のトリス緩衝液、リン酸緩衝液、HEPES緩衝液、MES緩衝液などの緩衝液。pHは用いる緩衝液によって異なるが、pH5.0～9.0の範囲が望ましい）に懸濁した後、用いる宿主細胞に適した方法で細胞を破壊し、遠心分離により宿主細胞の内容物を得る。一方、本発明によるタンパク質が宿主細胞外に分泌される場合には、遠心分離やろ過などの操作により宿主細胞と培地を分離し、培養ろ液を得る。宿主細胞破壊液、あるいは培養ろ液はそのまま、または硫酸沈殿と透析を行なった後に、そのタンパク質の単離・精製に供することができる。単離・精製の方法としては、以下の方法が挙げることができる。即ち、当該タンパクに6×ヒスチジンやGST、マルトース結合タンパクといったタグを付けている場合には、一般に用いられるそれぞれのタグに適したアフィニティークロマトグラフィーによる方法を挙げることができる。一方、そのようなタグを付けずに本発明に係るタンパク質を生産した場合には、例えば後述する実施例に詳しく述べられている方法、即ちイオン交換クロマトグラフィーによる方法を挙げることができる。また、これに加えてゲ

ルろ過や疎水性クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィーなどを組み合わせる方法も挙げることができる。

本発明に係る酵素タンパク質を、糖タンパク質、オリゴ糖または多糖等に作用させることにより、所定の糖残基が転移される。従って、本発明に係る酵素は、糖タンパク質の糖鎖の修飾や、糖類の合成に用いることができる。さらに、この酵素を免疫原として動物に投与することにより、該酵素に対する抗体を作製することができ、該抗体を用いて免疫測定法により該酵素を測定することが可能になる。従って、本発明による酵素及びこれをコードする核酸は、このような免疫原の作製に有用である。

本発明の発現ベクターは、上記のような酵素の単離・精製が容易となるように構築されていることが好ましい。特に、酵素活性を有するポリペプチドと標識ペプチドとの融合タンパク質の形態で発現するように構築した本発明による発現ベクターを用いて遺伝子工学的に当該酵素を調製すれば、単離・精製は容易である。

【0053】

上記識別ペプチドの例としては、本発明に係る酵素を遺伝子組み換えによって調製する際に、該識別ペプチドと酵素活性を有するポリペプチドとが結合した融合タンパク質として発現させることにより、形質転換体の生育物から本発明に係る酵素の分泌・分離・精製又は検出を容易にすることを可能とする機能を有したペプチドである。このような識別ペプチドとしては、例えばシグナルペプチド（多くのタンパク質のN末端に存在し、細胞内の膜透過機構においてタンパク質の細胞外へ輸送のために細胞内では機能している15～30アミノ酸残基からなるペプチド；例えばOmpA、OmpT、Dsb等）、プロテインキナーゼA、プロテインA（黄色ブドウ球菌細胞壁の構成成分で分子量約42,000のタンパク質）、グルタチオンS転移酵素、~~ヒスチジン~~ヒスチジン残基を6乃至10個並べて配した配列）、mycタグ（cMycタンパク質由来の13アミノ酸配列）、FLAGペプチド（8アミノ酸残基からなる分析用マーカー）、T7タグ（gene10タンパク質の最初の11アミノ酸残基からなる）、~~ミタグ~~ミタグ（RNaseA由来の15アミノ酸残基からなる）、HSVタグ、pelB（大腸菌細胞壁タンパク質pelBの22アミノ酸配列）、HAタグ（ヘマグルチニン由来の10アミ

ノ酸残基からなる)、Trxタグ(チオレドキシン配列)、CBPタグ(カルモジュリン結合ペプチド)、CBDタグ(セルロース結合ドメイン)、CBRタグ(コラーゲン結合ドメイン)、 β -lac/blu(β ラクタマーゼ)、 β -gal(β ガラクトシダーゼ)、luc(ルシフェラーゼ)、HP-Thio(His-patchチオレドキシン)、HSP(熱ショックペプチド)、Ln γ (ラミニン γ ペプチド)、Fn(フィブロネクチン部分ペプチド)、GFP(緑色蛍光ペプチド)、YFP(黄色蛍光ペプチド)、CFP(シアン蛍光ペプチド)、BFP(青色蛍光ペプチド)、DsRed、DsRed2(赤色蛍光ペプチド)、MBP(マルトース結合ペプチド)、LacZ(ラクトースオペレーター)、IgG(免疫グロブリンG)、アビジン、プロテインG等のペプチドが挙げられ、何れの識別ペプチドであっても使用することが可能である。その中でも特にシグナルペプチド、プロテインキナーゼA、プロテインA、グルタチオンS転移酵素、Hisタグ、mycタグ、FLAGペプチド、T7タグ、Sタグ、HSVタグ、pelB又はHAタグが、遺伝子工学的手法による本発明に係る酵素の発現、精製がより容易となることから好ましく、特にFLAGペプチド(Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys)(配列番号6)との融合タンパク質として本発明に係る酵素を得るのが、取扱面で極めて優れているため好ましい。上記FLAGペプチドは非常に抗原性であり、そして特異的なモノクローナル抗体が可逆的に結合するエピトープを提供し、発現された組換えタンパク質の迅速なアッセイおよび容易な精製を可能にする。4E11と称されるネズミハイブリドーマは、米国特許第5,011,912(これを参照することにより本願明細書の開示に組み込む)に記載されるように、特定の二価金属陽イオンの存在下で、FLAGペプチドに結合するモノクローナル抗体を産生する。4E11ハイブリドーマ細胞株は、寄託番号HB 9259下に、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American Type Culture Collection)に寄託されている。FLAGペプチドに結合するモノクローナル抗体は、Eastman Kodak Co., Scientific Imaging Systems Division、コネチカット州ニューヘヴンより入手可能である。

【0054】

ほ乳類細胞で発現可能であって、かつ上述のFLAGペプチドとの融合タンパク質として本発明に係る酵素を得ることができる基本ベクターとしては例えばpFLAG-CMV-1(シグマ社)ある。また、昆虫細胞で発現可能なベクターとしては、pFBIF

(pFastBac (インビトロジェン社) にFLAGペプチドをコードする領域を組み込んだベクター: 後述の実施例参照) 等が例示されるが、当業者であれば、当該酵素の発現に使用する宿主細胞、制限酵素、識別ペプチドなどから判断して適当な基本ベクターを選択することが可能である。

【0055】

(4) 本発明に係るタンパク質を認識する抗体

本明細書において、本発明の核酸によりコードされる糖転移酵素タンパク質に免疫反応性である抗体が提供される。こうした抗体は、(非特異的結合と対照的に) 抗体の抗原結合部位を介して、該糖転移酵素タンパク質に特異的に結合する。したがって、上述のような、配列番号2のタンパク質、断片、変異体、融合タンパク質などを、それと免疫反応性である抗体を産生する際の「免疫原」として使用することが可能である。より具体的には、タンパク質、断片、変異体、融合タンパク質などは、抗体形成を引き出す抗原決定基またはエピトープを含む。これらの抗原決定基またはエピトープは、直鎖でも高次構造的 (conformational) (断続的) でもどちらでもよい。なお、該抗原決定基またはエピトープは、当該技術分野に知られるいかなる方法によって同定してもよい。

したがって、本発明の1つの側面は、本発明の核酸によりコードされる糖転移酵素タンパク質の抗原性エピトープに関する。こうしたエピトープは、以下により詳細に記載されるように、抗体、特にモノクローナル抗体を作成するのに有用である。さらに、本発明に係る糖転移酵素タンパク質のエピトープは、アッセイにおいて、そしてポリクローナル血清または培養ハイブリドーマ由来の上清などの物質から特異的に結合する抗体を精製する研究試薬として使用可能である。こうしたエピトープまたはその変異体は、固相合成、タンパク質の化学的または酵素的切断などの、当該技術分野に公知の技術を用いて、あるいは組換えDNA技術を用いて、産生することが可能である。

前記糖転移酵素タンパク質によって誘導される可能性がある抗体に関しては、該タンパク質の全部若しくは一部が単離されていても、またはエピトープが単離されていても、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体はどちらも、慣用的技術によって調製することが可能である。例えば、Kennetら (監修), Monocl

onal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, New York, 1980を参照されたい。

【0056】

本発明の糖転移酵素タンパク質に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株もまた、本明細書に意図される。こうしたハイブリドーマは、慣用的技術によって産生しそして同定することが可能である。こうしたハイブリドーマ細胞株を産生するための1つの方法は、動物を該糖転移酵素タンパク質で免疫し；免疫された動物から脾臓細胞を採取し；前記脾臓細胞を骨髓腫細胞株に融合させ、それによりハイブリドーマ細胞を生成し；そして該酵素に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を同定することを含む。モノクローナル抗体は、慣用的技術によって回収可能である。

【0057】

本発明に係るモノクローナル抗体には、キメラ抗体、例えば、ネズミモノクローナル抗体のヒト化型が含まれる。こうしたヒト化抗体を既知の技術によって調製し、そして抗体がヒトに投与されるとき、免疫原性の減少という利点を提供してもよい。

慣用的技術によって産生可能な、抗体の抗原結合断片もまた、本発明に含まれる。こうした断片の例には、限定されるわけではないが、FabおよびF(ab')₂断片が含まれる。遺伝子工学技術によって産生される抗体断片および誘導体もまた提供される。

本発明に係る抗体は、in vitro又はin vivoいずれかで、前記糖転移酵素タンパク質または断片の存在を検出するアッセイで用いることが可能である。抗体はまた、免疫アフィニティークロマトグラフィーによって、本発明のポリペプチドまたは断片を精製する際にも使用可能である。

【0058】

さらに、結合パートナー、例えば受容体基質への前記糖転移酵素タンパク質の結合を遮断することが可能な抗体を用いて、こうした結合から生じる生物学的活性を阻害することが可能である。こうした遮断抗体は、受容体基質を発現している特定の細胞への該タンパク質の結合を阻害する能力に関して、抗体を試験する

ことによるなど、いかなる適切なアッセイ法を用いて、同定してもよい。あるいは、遮断抗体は、標的細胞の結合パートナーに結合している本発明に係る酵素から生じる生物学的影響を阻害する能力に関するアッセイにおいて、同定することが可能である。

こうした抗体を、in vitro法で使用するか、又はin vivoで投与して、抗体を生成した実体によって仲介される生物学的活性を阻害することが可能である。したがって、本発明の糖転移酵素タンパク質と結合パートナーとの相互作用によって、（直接または間接的に）引き起こされるかまたは悪化される障害を治療することが可能である。療法は、結合パートナー仲介生物学的活性を阻害するのに有効な量の遮断抗体を、ほ乳動物にin vivo投与することを伴う。一般的に、こうした療法の使用には、モノクローナル抗体が好ましい。1つの態様において、抗原結合抗体断片が使用される。

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もともと、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0059】

【実施例】

実施例1

本発明DNAのクローニング

公知の糖転移酵素である β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素の配列をクエリーとしてBLAST検索を行い、その結果、相同性を有する配列としてゲノム配列を見出した。

大腸菌細胞株colo205よりRNAをRNeasy Mini Kit（キアゲン社製）で抽出し、Super-Script First-Strand Synthesis System（インビトロジェン社製）を用いたoligo (dT)法によりsingle strand DNAとした。このDNAを鋳型とし、5' プライマー（配列番号3）および3' プライマー（配列番号4）を用いてPCRを行った。PCRの条件は94℃ 30秒、65℃ 1分、72℃ 1分を25サイクルとした。PCRにより得られたDNA断片は制限酵素サイトとしてORFの開始コドンの5'側にHindIIIをストップコドンの3'側にEcoRIを有する。

このDNA断片とpBluescript[®]RSKII(-)を各々制限酵素であるHindIII及びEcoRIに

より処理した後、反応液を混合しライゲーション反応を行うことでpBluescript^R SKII(-) (TOYOBO社製) にG9のそのORFを導入した。反応液をエタノール沈殿法により精製した後、コンピテントセル (大腸菌DH5 α) と混合し、ヒートショック法 (42℃、30秒) を行い、IPTGおよびX-galを含むLB寒天培地に播いた。翌日白い単独コロニーを更に培養し、プラスミドDNAを回収した。

回収されたプラスミドDNAに目的の核酸配列が含まれていることを確認し、塩基配列を決定した (配列番号1)。その塩基配列中の予測されるオープンリーディングフレーム (ORF) は1194 bpであり、また予測アミノ酸配列にして397アミノ酸 (配列番号2) からなる。そのN末端に糖転移酵素の特徴である疎水アミノ酸領域を有する。該核酸配列および該アミノ酸配列からなるものをG9と命名した。

【0060】

G9が組み込まれる上記pBluescript^R SKII(-)は、クローニング操作やシーケンシング操作をより簡便に行うために開発された多機能ベクターであり、従来のpUCやM13ベクターの機能以外に、様々な改良がなされている。pUCベクターと同様に、LacZ遺伝子中にマルチクローニングサイトがあるため、インサートが入ったプラスミドを、XL1-Blue MRF' やJM109などのlacZ Δ M15の遺伝子型を持つ大腸菌を形質転換すれば、IPTG/X-gal添加プレートで白色コロニーを形成し、インサートの有無を簡単に判定できる。また、マルチクローニングサイトは、21個の制限酵素サイトからなるポリリンカーを有するため、Exo/Mung Systemによりデリベーション変異体を作製する場合、使用する制限酵素の選択の幅が広がっている。組み込まれたG9遺伝子は、LacZオペレーター/プロモーターによって、lacI^q変異を持つ大腸菌内で発現を調節でき、IPTGを培地に添加することによって、目的タンパク質を大腸菌に産生させることができる。さらに、そのマルチクローニングサイトの両側には、T3およびT7のプロモーターがあるので、これらのプロモーターによるRNAプローブの作製も可能である。それら両プロモーター配列の両端にはBssHIIサイトがあり、これを利用して挿入DNAをプロモーター配列ごと切り出すことができる。両プロモーターのプローブを利用してジーンマッピングを行うことも可能である。このようなベクターには、f1ファージの複製開始領域が含

まれており、VCSM13やR468ヘルパーファージの感染により、一本鎖DNAを産生させ、シーケンスやSite Specific Mutagenesisに使用できる。ヘルパーファージの感染によりアンチセンス側の鎖がレスキューされる。

【0061】

実施例 2

ヒト大腸癌組織における本発明DNAの発現量

定量的リアルタイムPCR法を用いてヒト大腸癌組織と同一患者の正常大腸癌組織でのG9遺伝子の発現量を比較した。

定量的リアルタイムPCR法とはPCRにおいてセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーに加え、蛍光標識されたプローブを組み合わせる方法である。PCRにより増幅する際、プローブの蛍光標識が外れて蛍光を示す。蛍光強度が遺伝子の増幅に相関して増幅するためこれを指標として定量を行う。

【0062】

ヒト大腸癌組織と同一患者の正常大腸癌組織のRNAをRNeasy Mini Kit (キアゲン社製) で抽出し、Super-Script First-Strand Synthesis System (インビトロジェン社製) を用いたoligo (dT) 法によりsingle strand DNAとした。このDNAを鋳型として用いて5' プライマー (配列番号5)、3' プライマー (配列番号6) 及びTaqManプローブ (配列番号7) を用いて、ABI PRISM 7700 (アプライドバイオシステムズジャパン社製) により定量的リアルタイムPCRを行った。PCRの条件は、50℃ 2分、95℃ 10分で反応させた後、95℃ 15秒、60℃ 1分を50回繰り返した。得られた測定値は、個体間のばらつきを補正するため内標準遺伝子としてアプライドバイオシステムズジャパン社製のキットを用いて定量した β -actinにより除し、ヒト大腸癌組織の測定値と、同一患者の正常大腸癌組織の測定値との間で比較を行った。

その結果、癌化していない組織において本発明DNAの転写産物は存在しないが、癌化した組織においては本発明DNAの転写産物が有意に存在していることが明らかとなった (表3参照)。

【0063】

【表 3】

患者番号	正常組織	癌化組織
患者1	0	0.0052
患者2	0	0.0004
患者3	0	0.0023
患者4	0	0.0012
患者5	0	0.0018
患者6	0	0.0028
患者7	0	0.0007
患者8	0	0.0057
平均	0.0000000	0.0025125

【0064】

ヒト末梢血における本発明DNAの発現量

定量的リアルタイムPCR法を用いて、健常者と大腸癌患者とで末梢血におけるG9遺伝子の発現量を比較した。

健康なボランティアおよび大腸癌患者よりPAXgene blood RNA tube (PreAnalytix社製) に採血した。tube内の試薬と転倒混和し、24時間室温において反応させた後、RNAをPAXgene blood RNA kit (PreAnalytix社製) で抽出した。Super-Script First-Strand Synthesis System (インビトロジェン社製) を用い、添付のrandom primersにてcDNAを合成した。このDNAを鋳型として用いて、5' プライマー (配列番号4)、3' プライマー (配列番号5) 及びTaqMan プローブ (配列番号6) を用いて、ABI PRISM 7700 (アプライドバイオシステムズジャパン社製) により定量的リアルタイムPCRを行った。PCRの条件は、50℃ 2分、95℃ 10分で反応させた後、95℃ 15秒、60℃ 1分を50回繰り返した。得られた測定は、個体間のばらつきを補正するため内標準遺伝子としてアプライドバイオシステムズジャパン社製のキットを用いて定量した β -actinにより除し、健常者と大腸癌患者との間で比較を行った。

【0065】

その結果、健常者に比較して大腸癌患者の末梢血における本発明DNAの転写レベルは有意に上回っていることが明らかとなった。大腸癌患者のうち、健常者の平均測定値+ (標準偏差×2) を超えるものを陽性と判断する場合、大腸癌患者の陽性率は67%であった (表4参照)。

【0066】

【表4】

番号	健常者	大腸癌患者	判定
1	90	121	陽性
2	107	68	陰性
3	82	199	陽性
4	81	418	陽性
5	87	123	陽性
6		92	陰性
7		196	陽性
8		86	陰性
9		473	陽性
10		267	陽性
11		110	陽性
12		46	陰性
平均	89.4	183.3	
標準偏差	9.4	132.1	

【0067】

実施例3単離されたG9全長の発現

pBluescript RSK11(-)にG9を組込んだプラスミドDNAおよびpcDNA3.1(インビトロジェン社)を各々制限酵素であるHindIIIおよびEcoRIにより処理した後、反応液を混合しライゲーション反応を行うことでpcDNA3.1(+)にG9のORFを導入した。反応液をエタノール沈澱法により精製した後、配列を確認しpcDNA3.1(+)にG9が導入されたことを確認し、これをpcDNA3.1(+)-G9とした。pcDNA3.1(+)-G9をコンピテントセル(大腸菌DH5 α)と混合し、ヒートショック法(42℃、45秒)を行い、アモキシシリンを含むLB寒天培地に播いた。翌日単独コロニーを更に培養し、プラスミドDNAを回収した。回収したプラスミドDNAに目的の核酸配列が含まれていることを確認し、塩基配列を決定した。

【0068】

pcDNA3.1(+/-)は、広範囲な哺乳類細胞の発現用ベクターである。forward転写用ベクターであり、発現レベルを上げるため従来のpcDNA3.1を改良してマルチクローニングサイト(MCS)配列からRNAの二次構造を形成する可能性のある配列を除去している。CMVのエンハンサー／プロモーターがあり高いレベルでの発現が可

能である。ポリアデニル化シグナルと転写終結配列によりRNAが安定化される。SV40オリジンがあるため、SV40 Large T抗原を発現している細胞で複製が可能である。大腸菌での選択用にアンピシリン抵抗性遺伝子が導入されている。また、哺乳類細胞において安定株を作製するための選択用としてネオマイシン抵抗性遺伝子が導入されている。

【0069】

ヒト大腸癌由来細胞株であるHCT15細胞を用いてG9発現安定株を作製するため、以下の操作を行った。HCT15細胞 2×10^6 個を抗生物質を含まない10%ウシ胎児血清入りDMEM培地10mlにて懸濁し、10cmディッシュに播き、16時間37℃にてCO₂インキュベーターで培養した。pcDNA3.1(+)-G9のプラスミドDNA20ng及びLipofectamin 2000(インビトロジェン社)30 μ lをOPTI-MEM(インビトロジェン社)1.5mlと各々混和し、室温にて5分間インキュベーションした。更に2つの液を緩やかに混和し、室温にて20分間インキュベーションした。この混合液をディッシュに滴下し、48時間37℃にてCO₂インキュベーターにて培養した。定法により細胞を継代した。このとき培地はDMEM(インビトロジェン社)を用い、ウシ胎児血清および抗生物質としてペニシリン(インビトロジェン社)、ストレプトマイシン(インビトロジェン社)およびジェネチシン(ネオマイシン、インビトロジェン社)を添加した。ジェネチシンを添加することによりpcDNA3.1(+)-G9が導入されていない細胞は死滅していくので、培養を続けることでpcDNA3.1(+)-G9が導入された細胞のみが生存することになる。これをG9発現安定株とした。

【0070】

哺乳類細胞株におけるG9組換えタンパク質の発現

G9の組換えタンパク質を得るためにヒト腎臓由来細胞株293Tで発現させた。機能を確認するには、少なくとも β 1-3GlcNAc転移酵素および β 1-3Gal転移酵素と比較的相同性が保たれている配列番号1-405番アミノ酸からC末端までの活性領域を発現させれば十分であると考えられるが、ここではG9の24番アミノ酸及び33番アミノ酸からC末端までの2種類の予測活性領域を発現させることとした。

【0071】

pBluescriptR SK11(-)にG9を組込んだプラスミドDNAを鋳型とし、5' プライ

マー（配列番号 8 及び配列番号 9）と 3' プライマー（配列番号 1 0）を用いて PCR 反応を行い目的の DNA 断片を得た。PCR 法は 94℃ 30 秒、65℃ 1 分、72℃ 1 分を 25 サイクルとした。そして、PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し、ゲル切り出し法でゲルを切り出して定法により単離した。この PCR 産物は制限酵素サイトとして 5' 側に HindIII、3' 側に EcoRI を有していた。この DNA 断片と pFLAG-CMV3 を各々制限酵素である HindIII 及び EcoRI にて処理した後、反応液を混合し、ライゲーション反応を行うことで pFLAG-CMV3 に導入した。反応液をエタノール沈殿法により精製した後、コンピテントセル（大腸菌 DH5 α ）と混合し、ヒートショック法（42℃、45 秒）を行い、アンピシリンを含む LB 寒天培地に播いた。

【 0 0 7 2 】

翌日得られたコロニーを、直接 PCR で目的 DNA を確認した。さらに確実を期すためシーケンシングにより DNA 配列の確認をした後、ベクター（pFLAG-CMV3）を抽出・精製した。

ヒト腎臓細胞由来細胞株 293T 細胞 2×10^6 個を抗生物質を含まない 10% ウシ胎児血清入りの DMEM 培地 10ml にて懸濁し、10cm ディッシュに播き、16 時間 37℃ にて CO₂ インキュベーターにて培養した。pFLAG-CMV3-G9 の 20ng 及び Lipofectamin2000（インビトロジェン社）30 μ l を OPTI-MEM（インビトロジェン社）1.5ml と各々混和し、室温にて 5 分間インキュベーションした。更に 2 つの液を緩やかに混和し、室温にて 20 分間インキュベーションした。この混合液をディッシュに滴下し、48 時間 37℃ にて CO₂ インキュベーターにて培養した。

【 0 0 7 3 】

上清 10ml に Na₂N₃（0.05%）、NaCl（150ml）、CaCl₂（2ml）、抗 M1 レジン（Sigma 社）（100 μ l）を混合し、4℃ で一夜攪拌した。翌日遠心して（3000rpm 5 分、4℃）ペレットを回収し、2ml の CaCl₂・TBS を 900 μ l 加えて再度遠心（2000rpm 5 分、4℃）し、ペレットを 200 μ l の 1ml CaCl₂・TBS に浮遊させ活性測定サンプル（G9 酵素液）とした。この一部を SDS-PAGE による電気泳動について抗 FLAGM2-ペルオキシダーゼ（Sigma 社製）を用いてウェスタンブロッティングを行い、目的とする G9 タンパク質の発現を確認した。その結果、約 45kDa の位置にバンドが検出、発現が確認された。

【0074】

昆虫細胞株におけるG9組換えタンパク質の発現

G9の組換えタンパク質を得るためにG9を昆虫細胞内で発現させた。機能を確認するには、少なくとも β 1-3GlcNAc転移酵素および β 1-3Gal転移酵素と比較的相性が保たれている配列番号1中の105番アミノ酸からC末端までの活性領域を発現させれば十分であると考えられるが、ここではG9の36番アミノ酸からC末端までの予測活性領域を発現させることとした。

pBluescriptR SK11(-)にG9を組込んだプラスミドDNAを鋳型とし、5' プライマー (配列番号11) と3' プライマー (配列番号12) を用いてPCR反応を行い目的のDNA断片を得た。PCR法は94℃ 30秒、65℃ 1分、72℃ 1分を25サイクルとした。そして、PCR産物をアガロースゲル電気泳動し、ゲル切り出し法でゲルを切り出して定法により単離した。このようにして単離したPCR産物をBPクロナーゼ反応によってpDONR201 (商標) (インビトジェン社製) へ組み込んで「エントリークローン」を作成した。

【0075】

反応は上記PCR産物2 μ l、pDONR201 1 μ l (150ng)、BP反応緩衝液2 μ l、トリス-EDTA緩衝液 (pH8.0: 以下「TE」とも略記する) 3 μ l、BPクロナーゼmix 2 μ lを25℃で1時間インキュベーションして行った。その後、プロテイナーゼK (科研製薬株式会社製) を1 μ l加えて37℃、10分間インキュベートして反応を終了させた。その反応混合液11 μ lをコンピテントセル (大腸菌DH5 α) 100 μ lと混合し、ヒートショック法による形質転換の後、カナマイシンを含むLBプレートに播いた。翌日コロニーを回収し、PCR法で目的DNAが導入されていること及びその塩基配列を確認し、挿入されたベクター (pDONR-G9) を常法に従って抽出、精製した。このベクターに挿入されたDNAの塩基配列は、配列番号1記載の塩基配列を含むことが確認された。

【0076】

発現クローンの調製

上記エントリークローンは、挿入部位の両端に λ ファージが大腸菌から切り出される際の組換え部位であるattLを持つもので、LRクロナーゼ (λ ファージの組換え

酵素Int、IHF、Xisを混合したもの)とデスチネーションベクター (attRを有する)とを混合することで、挿入部位がデスチネーションベクターに移り、発現クローンが作成された。

1 μ lのエントリークローン (pDONR-G9)、0.5 μ lのデスチネーションベクター (pFBIF (75ng))、LR反応緩衝液2 μ l、TE4.5 μ l、LRクロナーゼミックス (入ファージの組換え酵素Int、IHF、及びXisを混合した溶液) 2 μ lを25℃で1時間インキュベートし、プロテイナーゼK (科研製薬株式会社製)を1 μ l加えて37℃で10分間インキュベートして反応を停止させた (この組換え反応でpFBIF-G9が生成される)。pFBIFはpFastBac1 (インビトロジェン社製)にIg κ シグナル配列と精製用のFLAGペプチドとを常法に従って挿入した。さらに、pFBIFにGateway配列 (attR)を挿入するため、Gateway Vector Conversion System (インビトロジェン社)を用いて変換カセットを挿入した。この変換カセットは、発現ベクターをデスチネーションベクターに改変するためのカセットであり、attR組換え部位、グロースドメイン耐性遺伝子、及び大腸菌DNA gyraseを阻害するタンパク質をコードするccdB遺伝子を有する。また、Ig κ シグナル配列は発現タンパク質を分泌型にするため、FLAGタグは精製を容易とするために挿入された。

10077]

pFBIF-G9が含まれる反応混液 (11 μ l)とコンピテントセルである大腸菌DH5 α 100 μ lとを混合し、ヒートショック法による形質転換の後、アンピシリンを含むLB培地に組換えDH5 α を蒔いて培養した。24時間培養後、コロニーを回収し、QIAprep Spin Miniprep Kit (キアゲン社製)によりプラスミド (pFBIF-G9)を抽出した。PCR法で目的DNAが挿入されていることを確認した。

Bac-to-Bacシステム (インビトロジェン社製)によるバクミドの調製

続いてBac-to-Bacシステム (インビトロジェン社製)を用いて上記pFBIF-G9とバクミドの間で組換えを行い、昆虫細胞中で増殖可能なバクミドにG9の配列を挿入した。このシステムは、Tn7の組換え部位を利用しバクミドを含む大腸菌 (大腸菌DH10Bac (商標))に目的遺伝子を挿入させたpFastBac (即ち、pFBIF-G9)を導入するだけで、ヘルパープラスミドから産生させる組換えタンパク質によってコードする遺伝子 (G9)がバクミドに取り込まれるシステムである。またバク

ミドにはLacZ遺伝子が含まれており、古典的なコロニーの色（青（挿入なし）－白（挿入あり））による選択が可能である。

すなわち、上記精製ベクター（pFBIF-G9）50 μ lとコンピテントセル（大腸菌DH10Bac）50 μ lとを混合し、ヒートショック法による形質転換の後、カナマイシン、ゲンタマイシン、テトラサイクリン、5-ブロモインドリル β -D-ガラクトピラノシド（Blue-gal）、及びイソプロピル β -D-チオガラクトピラノシド（IPTG）を含むLB培地に蒔き、24時間後にバクミドに目的DNAが挿入された白い独立したコロニーを回収し、更に培養を行った後、常法に従ってバクミドを回収した。

【0078】

バクミドの昆虫細胞への導入

回収したバクミドに目的DNAが挿入されていることを常法に従って確認し、バクミドを昆虫細胞（Sf21：インビトロジェン社製）に導入した。すなわち35mmのシャーレにSf21細胞 9×10^5 個/2mlに抗生物質を含むSf900SFM培地（インビトロジェン社製）を添加し、27℃で1時間細胞を接着させた。細胞が接着したことを確認して、培養液を吸引して、lipid-DNA complexes溶液（A溶液（100 μ lのSf-900SFMに上記バクミド5 μ lを添加した混合物）とB溶液（100 μ lのSf-900SFMに6 μ lのCell FECTION Reagent（インビトロジェン社製）を添加した混合物）とを丁寧に混合して30分間程度室温でインキュベートして得た溶液）にSf900II（インビトロジェン社製）800 μ lを添加した培養液を添加して27℃で5時間インキュベーションした。その後、培地を除去し、抗生物質を含むSf900SFM培地2mlを添加し、27℃で72時間インキュベートした。培養後ピペッティングにより細胞を遊離させ、細胞と培養液を回収して1000 \times gで10分間遠心処理を行い、上清を回収した（この上清を「一次ウイルス液」とする）。

【0079】

更にT75培養フラスコにSf21細胞 1×10^7 個/20ml Sf-900SFM（抗生物質を含む）を添加し、27℃で1時間インキュベートした。細胞が接着した後、一次ウイルス液800 μ lを添加し、27℃で48時間培養する。培養後、ピペッティングにより細胞を遊離させ、細胞と培養液を回収した。これを1000 \times gで10分間遠心処理を行い、上清を回収した（この上清を「二次ウイルス液」とする）。

さらに、T75培養フラスコにSf21細胞 1×10^7 個/20ml Sf-900SFM（抗生物質を含む）を添加し、27℃で1時間インキュベートした。細胞が接着した後、二次ウイルス液1000 μ lを添加し、27℃で84時間培養した。培養後、ピペッティングにより細胞を遊離させ、細胞と培養液を回収した。これを1000 \times gで10分間遠心処理を行い、上清を回収した（この上清を「三次ウイルス液」とする）。

さらに、Sf21細胞を 6×10^5 個/mlの濃度で含むSf-900SFM（抗生物質を含む）を100ml用スピナーフラスコに100 μ l添加し、三次ウイルス液1mlを添加し、27℃で96時間培養した。培養後、細胞と培養液を回収した。これを1000 \times gで10分間遠心処理を行い、上清を回収した（この上清を「四次ウイルス液」とする）。

四次ウイルス液10mlに対し、アジ化ナトリウム、塩化ナトリウム及び塩化カルシウムを加えた。終濃度はアジ化ナトリウムを0.05%、塩化ナトリウムを150mM、塩化カルシウムを2mMとする。抗FLAG抗体ゲル（Anti-Flag M1 monoclonal antibody Agarose Affinity Gel、シグマ社製）を50 μ l添加し、4℃で16時間緩やかに転倒混和した。遠心分離（1,000 \times g、3分、4℃）して上清を除去した後、1mMの塩化カルシウムを含むTBS（Tris-NaCl緩衝液：pH7.4）で2回洗浄した。そして洗浄後のアフィニティーゲルを1mMの塩化カルシウムを含むTBS（pH7.4）200 μ lに懸濁して、この懸濁液を活性測定用のG9酵素液とした。

【0080】

実施例5

酵素活性の測定

配列番号2記載のアミノ酸配列を基に、他の公知の糖転移酵素と対比した結果、~~糖鎖~~部位と考えられるC-末端領域の配列の保存性などから、G9は転移酵素類に分類されることが示唆された。そこで、例えば、UDP-GlcNAcをGlcNAc供与体基質として用いて、上記実施例3又は4で得られたG9酵素液の酵素活性を確認することである。

【0081】

例えば、GlcNAc受容体基質としては、GalNAc α 1-Bz、GalNAc β 1-pNp、GlcNAc α 1-Bz、GlcNAc β 1-Bz、Gal α 1-pNp、Gal β 1-oNp、Xyl β 1-pNp、Fuc α 1-pNp、Man α 1-Bz、ManNAc α 1-Bz、Gal β 1-4Glc β 1-Bz（以上全てシグマ社製

)、及びGal β 1-4GlcNAc α 1-pNp (トロントリサーチケミカル社製) 等を用い、各々最終濃度で10nmolずつ含むように反応液を調製して活性を確認するとよい。

例えば、反応液は最終濃度50mMのカコジル酸ナトリウム緩衝液 (pHを6.6、7.0、及び7.4の各実験系を調製する)、最終濃度0.4%のTriton (商標) CF-54 (シグマ社製)、最終濃度480 μ MのUDP-GlcNAc、175nCiのUDP-[14 C]GlcNAc、最終濃度20mMのMgCl₂、CoCl₂又はCuCl₂、10.1 μ lのG9酵素液、及び蒸留水を含む全量20 μ lとする。

【0082】

例えば、反応液は37℃で16時間インキュベートし、その後蒸留水200 μ lを添加し、不溶性画分を遠心分離 (100 \times g、10分) により除去して上清画分を回収する。Sep-Pak plus C18 Cartridge (ウォーターズ社製: 予め1mlのメタノールで1回、次いで1mlの蒸留水で2回洗浄して平衡化したもの) に通筒し、上清に含まれる特定受容体基質及び反応生成物を吸着させることができる。1mlの蒸留水でカラムを2回洗浄し、カラムに吸着した特定受容体基質と反応生成物を1mlのメタノールで溶出する。溶出液を5mlの液体シンチレーター (アマシャム バイオサイエンス株式会社製) と混和し、シンチレーションカウンターを用いて放射活性を測定することができる。

その結果から、例えば、至適 pH、EDTAにより二価金属陽イオンをキレートした条件下での酵素活性、例えば、マンガンイオン (Mn²⁺) で酵素活性の増強などが明らかになる。

【0083】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
Fujirebio Incorporated

<120> Novel glycosyl transferase, a DNA encoding the same, and a meth

od for detection for cancer

<130> 022164

<160> 7

<210> 1

<211> 1194

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgcgctgcc ccaagtgcct tctctgcctg tcagcactgc tcacactcct gggcctcaaa 60
gtgtacatcg agtggacatc cgagtcccgg ctcagcaagg cctaccccag ccctcggggc 120
accccgccaa gccccacgcc agccaaccct gagcccaccc tacctgcaa cctctccacc 180
cgcttggggc agactatccc gctgcccttt gcttactgga accagcagca gtggcggctg 240
gggtccctgc ccagtgggga cagcactgaa acggggggct gccaggcttg gggggccgcc 300
gccgccaccg agatccctga cttgcctcc taccacaagg acctccgcg cttcttgctg 360
tcagcagcct gccggagctt cccacagtgg ctgcctggag gtggtggcag ccaagtctcc 420
agctgctcag atactgatgt cccctacctg ctgttggccg tcaagtcaga accagggcgc 480
tttgcagaac gacaggccgt gagagagacg tggggcagtc cagctccagg gatccggctg 540
cttctctgc tagggtctcc ggtgggtgag gcggggcctg acctagactc actagtggcc 600
tgggagagcc gtcgctacag tgacctgctg ctctgggact tcctcgacgt cccattcaac 660
cagacgtca aagacctgct gctgctggcc tggctgggcc gccactgccc caccgtgagt 720
tctctctgc gagctcagga cgatgccttt gtacacaccc ctgccctgct ggctcactg 780
cgggccctgc cacctgcctc ggcccgaagc ctctacctgg gtgaggtctt taccaggcc 840
atgcctctcc ggaagccagg aggacccttc tatgtgcccg agtccttctt cgaaggtggc 900
tctctctgc atgcaagcgg ggggtggctac gtcattgccg ggcgccctggc accctggctg 960
ctgcgggcgg cagcccgtgt ggcacccttc ccctttgagg acgtctacac tggcctttgc 1020

atccgagccc tgggcctggt gcccaggcc caccaggct tcctcacagc ctggccagca 1080
 gaccgactg cggaccactg tgctttccgc aacctgctgc tggtagggcc cctgggcccc 1140
 caggccagca ttcggctctg gaaacaactg caagacccaa ggctccagtg ctga 1194

<210> 2

<211> 397

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Cys Pro Lys Cys Leu Leu Cys Leu Ser Ala Leu Leu Thr Leu
 1 5 10 15
 Leu Gly Leu Lys Val Tyr Ile Glu Trp Thr Ser Glu Ser Arg Leu Ser
 20 25 30
 Lys Ala Tyr Pro Ser Pro Arg Gly Thr Pro Pro Ser Pro Thr Pro Ala
 35 40 45
 Asn Pro Glu Pro Thr Leu Pro Ala Asn Leu Ser Thr Arg Leu Gly Gln
 50 55 60
 Thr Ile Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Trp Asn Gln Gln Gln Trp Arg Leu
 65 70 75 80
 Gly Ser Leu Pro Ser Gly Asp Ser Thr Glu Thr Gly Gly Cys Gln Ala
 85 90 95
 Trp Gly Ala Ala Ala Ala Thr Glu Ile Pro Asp Phe Ala Ser Tyr Pro
 100 105 110
 Lys ~~Asp~~ Leu Arg Arg Phe ~~Leu~~ Leu ~~Ser~~ Ala Ala Cys Arg Ser ~~Phe~~ Pro
 115 120 ~~125~~
 Gln Trp Leu Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Ser Ser Cys Ser Asp
 130 135 140
 Thr Asp Val Pro Tyr Leu Leu Leu Ala Val Lys Ser Glu Pro Gly Arg

145 150 155 160
Phe Ala Glu Arg Gln Ala Val Arg Glu Thr Trp Gly Ser Pro Ala Pro
165 170 175
Gly Ile Arg Leu Leu Phe Leu Leu Gly Ser Pro Val Gly Glu Ala Gly
180 185 190
Pro Asp Leu Asp Ser Leu Val Ala Trp Glu Ser Arg Arg Tyr Ser Asp
195 200 205
Leu Leu Leu Trp Asp Phe Leu Asp Val Pro Phe Asn Gln Thr Leu Lys
210 215 220
Asp ~~Leu~~ Leu Leu Leu Ala Trp Leu Gly Arg His Cys Pro Thr Val Ser
225 230 235 240
Phe Val Leu Arg Ala Gln Asp Asp Ala Phe Val His Thr Pro Ala Leu
245 250 255
~~Leu Ala~~ ~~Leu~~ Arg Ala Leu Pro Pro Ala Ser Ala Arg Ser Leu Tyr
260 265 270
Leu Gly Glu Val Phe Thr Gln Ala Met Pro Leu Arg Lys Pro Gly Gly
275 280 285
Pro Phe Tyr Val Pro Glu Ser Phe Phe Glu Gly Gly Tyr Pro Ala Tyr
290 295 300
Ala Ser Gly Gly Gly Tyr Val Ile Ala Gly Arg Leu Ala Pro Trp Leu
305 310 315 320
~~Leu~~ Ala Ala Ala Arg Val Ala Pro Phe Pro Phe Glu Asp Val Tyr
325 330 335
Thr Gly Leu Cys Ile Arg Ala Leu Gly Leu Val Pro Gln Ala His Pro
340 345 350
Gly Phe Leu Thr Ala Trp Pro Ala Asp Arg Thr ~~Ala~~ Asp His Cys Ala
355 360 365
~~Phe~~ ~~Ala~~ Leu Leu Leu Val Arg Pro Leu Gly Pro Gln Ala Ser Ile
370 375 380

Arg Leu Trp Lys Gln Leu Gln Asp Pro Arg Leu Gln Cys

385

390

395

<210> 3

<211>

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> 31

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR

<400> 3

ctcaagctta tgcgctgccc caagtcctt c

31

<210> 4

<211>

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> 31

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR

<400> 4

ctcagattct cagcactgga gccttgggtc

31

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for RT-PCR

<400> 5

gctgttggcc gtcaagtcag

20

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for RT-PCR

<400> 6

caggaagagc agccggat

18

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: probe for RT-PCR

<400> 7

cagaacgaca ggccgtga

18

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR

<400> 8

gccaaagctta catccgagtc ccggctcag

29

<210> 9

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR

<400> 9

gccaaagctta aggcctaccc cagccctcg

29

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR

<400> 10

cggaattctc agcactggag ccttgggt

28

<210> 11

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR

<400> 11

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cccagccct cggggcaccc cgcca

55

<210> 12

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR

<400> 12

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc tcagcactgg agccttgggt cttg

54

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規な核酸及び該核酸を用いた癌化検定方法を提供する。

【解決手段】 本発明の癌マーカー核酸は、配列番号 1 に記載の塩基配列又はその相補的な塩基配列にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸に関する。また、本発明の癌化検定方法は、典型的には、(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列又はその相補的な塩基配列にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸を使用して、生物試料中の該核酸の転写レベルを測定し；そして (b) 該生物試料中の該核酸の転写レベルが、対照の健常生物試料のそれを有意に上回る場合に、該生物試料が癌化していると判断することを含む方法である。

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号

[301021533]

1. 変更年月日

2001年 4月 2日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区霞が関1-3-1

氏 名

独立行政法人産業技術総合研究所

特願 2002-380975

ページ: 2/E

出願人履歴情報

識別番号

[000237204]

1. 変更新月日

1997年 5月12日

[変更理由]

住所変更

住所

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号

氏名

富士レビオ株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.